

☒ 48. Document ID: JP 2005130744 A

L1: Entry 48 of 53

File: DWPI

May 26, 2005

DERWENT-ACC-NO: 2005-369235

DERWENT-WEEK: 200538

COPYRIGHT 2005 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Identifying promoter/suppressor of p53 protein activation in mammalian cell, by culturing cell expressing GADD34 gene in presence of compound, detecting promoter/suppressor based on promotion or suppression of GADD34 gene expression

PRIORITY-DATA: 2003JP-0369150 (October 29, 2003)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
<u>JP 2005130744 A</u>	May 26, 2005		019	C12Q001/68

INT-CL (IPC): A61 K 31/7105; A61 K 31/711; A61 K 35/76; A61 K 45/00; A61 K 48/00; A61 P 29/00; A61 P 35/00; A61 P 43/00; C12 Q 1/02; C12 Q 1/68; G01 N 33/15; G01 N 33/50; G01 N 33/566

ABSTRACTED-PUB-NO: JP2005130744A

BASIC-ABSTRACT:

NOVELTY - Identifying (M1) an agent capable of promoting or suppressing the activation of p53 protein in a mammalian cell, comprising culturing a cell capable of expressing GADD34 gene in the presence and absence of a candidate compound, and detecting the compound capable of promoting or suppressing activation of the p53 protein based on the promotion or suppression of GADD34 gene expression, is new.

DETAILED DESCRIPTION - Identifying (M1) an agent capable of promoting or suppressing the activation of p53 protein in a mammalian cell, comprising:

(a) culturing a cell capable of expressing GADD34 gene in the presence and absence of the candidate compound; and

(b) detecting the promotion or suppression of GADD34 gene expression.

The therapeutic agent is identified as a promoter of activation of p53 protein if promotion of GADD34 gene expression is detected, and the therapeutic agent is identified as a suppressor of activation of p53 protein if suppression of GADD34 gene expression is detected. (M1) optionally involves:

(a) culturing a cell capable of expressing GADD34 gene and PP1 alpha gene, in the presence and absence of the candidate compound; and

(b) detecting the promotion or suppression of an interaction with GADD34 and PP1 alpha gene.

The therapeutic agent is identified as a promoter of activation of p53 protein if promotion of the interaction is detected, and the therapeutic agent is identified as a suppressor of activation of p53 if suppression of the interaction is detected.

INDEPENDENT CLAIMS are included for the following:

(1) promoting (M2) activation of p53 protein in a mammalian cell, by processing the target mammalian cell using a GADD34 gene expression promoter;

(2) a composition (C1) for treating the disease or failure, comprising a GADD34 gene expression promoter associated with activation of p53 protein, and a carrier; and

(3) a composition (C2) for treating the disease or failure, comprising a GADD34 gene expression inhibitor associated with inhibition of activation of p53 protein, and a carrier.

ACTIVITY - Cytostatic; Antiinflammatory.

MECHANISM OF ACTION - Modulator of activation of p53 protein.

No biological data is given.

USE - (M1) is useful for identifying an agent capable of promoting or suppressing the activation of p53 protein in a mammalian cell. (C1) is useful for treating a disease or failure such as cancer or tumor. (C2) is useful for treating a disease or failure such as inflammatory disease. (All claimed.)

ADVANTAGE - (M1) effectively identifies modulator of activation of p53.

Full	Title	Citation	Front	Review	Classification	Date	Reference			Claims	EMC	Draw B
------	-------	----------	-------	--------	----------------	------	-----------	--	--	--------	-----	--------

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-130744

(P2005-130744A)

(43) 公開日 平成17年5月26日(2005.5.26)

(51) Int. Cl. ⁷	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7105	A 6 1 K 31/7105	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/711	A 6 1 K 31/711	4 B 0 6 3
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 請求項の数 22 O L (全 19 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2003-369150 (P2003-369150)
 (22) 出願日 平成15年10月29日 (2003.10.29)

(71) 出願人 803000056
 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
 東京都中央区日本橋小伝馬町13-4
 (74) 代理人 100075812
 弁理士 吉武 賢次
 (74) 代理人 100091487
 弁理士 中村 行孝
 (74) 代理人 100094640
 弁理士 紺野 昭男
 (74) 代理人 100107342
 弁理士 横田 修孝
 (72) 発明者 磯 部 健 一
 愛知県大府市森岡町源吾36-3 国立療
 養所中部病院長寿医療研究センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 p 5 3 タンパク質の活性化を調節する薬物のスクリーニング法

(57) 【要約】

【課題】 p 5 3 タンパク質活性化調節剤のスクリーニング法の提供。

【解決手段】 哺乳動物細胞内における p 5 3 タンパク質の活性化を促進または抑制する薬物を同定する方法であって、(a) G A D D 3 4 遺伝子を発現しうる細胞を、候補薬物の存在下において、該候補薬物の不在下で前記細胞が G A D D 3 4 遺伝子を発現しうる条件下にて培養する工程、および (b) 工程 (a) により得られる細胞において、G A D D 3 4 遺伝子発現の促進または抑制を検出する工程、を含んでなり、工程 (b) において G A D D 3 4 遺伝子発現の促進が検出された場合には、その候補薬物が p 5 3 タンパク質の活性化を促進する薬物として同定され、工程 (b) において G A D D 3 4 遺伝子発現の抑制が検出された場合には、その候補薬物が p 5 3 タンパク質の活性化を抑制する薬物として同定される方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳動物細胞内における p 5 3 タンパク質の活性化を促進または抑制する薬物を同定する方法であって、

(a) G A D D 3 4 遺伝子を発現しうる細胞を、候補薬物の存在下において、該候補薬物の不在下で前記細胞が G A D D 3 4 遺伝子を発現しうる条件下にて培養する工程、および

(b) 工程 (a) により得られる細胞において、G A D D 3 4 遺伝子発現の促進または抑制を検出する工程を含んでなり、

10

工程 (b) において G A D D 3 4 遺伝子発現の促進が検出された場合には、その候補薬物が p 5 3 タンパク質の活性化を促進する薬物として同定され、工程 (b) において G A D D 3 4 遺伝子発現の抑制が検出された場合には、その候補薬物が p 5 3 タンパク質の活性化を抑制する薬物として同定される、方法。

【請求項2】

前記工程 (a) において用いられる細胞が哺乳動物細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記工程 (b) が、細胞内の G A D D 3.4 の m R N A 量を測定することを含んでなる、請求項1に記載の方法。

20

【請求項4】

前記工程 (b) が、細胞内の G A D D 3 4 タンパク質の量を測定することを含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記工程 (b) が、前記工程 (a) により得られる細胞における G A D D 3 4 遺伝子発現の強度と、候補化合物の不在下で培養された対照細胞における G A D D 3 4 遺伝子発現の強度とを比較することを含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

哺乳動物細胞内における p 5 3 タンパク質の活性化を促進または抑制する薬物を同定する方法であって、

30

(a) G A D D 3 4 遺伝子および P P 1 α 遺伝子を発現しうる細胞を、候補薬物の存在下において、該候補薬物の不在下で前記細胞が G A D D 3 4 遺伝子および P P 1 α 遺伝子を発現しうる条件下にて培養する工程、ならびに、

(b) 工程 (a) により得られる細胞において、G A D D 3 4 タンパク質と P P 1 α との相互作用の促進または抑制を検出する工程を含んでなり、

工程 (b) において、前記相互作用の促進が検出された場合には、その候補薬物が p 5 3 タンパク質の活性化を促進する薬物として同定され、工程 (b) において、前記相互作用の抑制が検出された場合には、その候補薬物が p 5 3 タンパク質の活性化を抑制する薬物として同定される、方法。

40

【請求項7】

前記工程 (a) において用いられる細胞が哺乳動物細胞である、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記工程 (b) が、核内の P P 1 α タンパク質の量を測定することを含んでなる、請求項6に記載の方法。

【請求項9】

核内の P P 1 α タンパク質量の減少が前記相互作用の促進を示すものであり、核内の P P 1 α タンパク質量の増加が前記相互作用の抑制を示すものである、請求項8に記載の方法。

50

【請求項 10】

前記工程 (b) が、細胞質中の P P 1 α タンパク質の量を測定することを含んでなる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 11】

細胞質中の P P 1 α タンパク質量の増加が前記相互作用の促進を示すものであり、細胞質中の P P 1 α タンパク質量の減少が前記相互作用の抑制を示すものである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記工程 (b) が、前記工程 (a) により得られる細胞における前記相互作用の強度と、候補化合物の不在下で培養された対照細胞における前記相互作用の強度とを比較することを含んでなる、請求項 6 に記載の方法。 10

【請求項 13】

哺乳動物細胞内における p 5 3 タンパク質の活性化を促進する方法であって、目的とする哺乳動物細胞を、G A D D 3 4 遺伝子発現促進剤を用いて処理する工程を含んでなる、方法。

【請求項 14】

G A D D 3 4 遺伝子発現促進剤が、G A D D 3 4 をコードする D N A を含んでなる発現ベクターである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

G A D D 3 4 遺伝子発現促進剤および医薬上許容される担体を含んでなる、p 5 3 タンパク質の活性化が治療上有効とされる疾患または障害を治療するための医薬組成物。 20

【請求項 16】

前記疾患または障害が癌または腫瘍である、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

G A D D 3 4 遺伝子発現促進剤が、G A D D 3 4 をコードする D N A を含んでなる発現ベクターである、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

G A D D 3 4 遺伝子発現抑制剤および医薬上許容される担体を含んでなる、p 5 3 タンパク質の活性化の阻害が治療上有効とされる疾患または障害を治療するための医薬組成物。 30

【請求項 19】

前記疾患または障害が炎症性疾患である、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

G A D D 3 4 遺伝子発現抑制剤が、G A D D 3 4 遺伝子の発現を特異的に抑制するアンチセンス核酸分子である、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

G A D D 3 4 遺伝子発現抑制剤が、G A D D 3 4 遺伝子の発現を特異的に抑制する s i R N A 核酸分子である、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

G A D D 3 4 遺伝子発現抑制剤が、G A D D 3 4 遺伝子の発現を特異的に抑制する s i R N A 核酸分子を発現するベクターである、請求項 18 に記載の医薬組成物。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、p 5 3 タンパク質活性化調節剤のスクリーニング法、p 5 3 タンパク質の活性化法、および p 5 3 タンパク質に関連する疾患を治療するための医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

G A D D 3 4 は、成長停止および D N A 損傷によって発現量が増加するタンパク質のうちの一つである。G A D D 3 4 は、G A D D 4 5 および G A D D 1 5 3 と同様に、チャイ 50

ニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞における紫外線 (UV) 誘導転写産物として発見されたものである (非特許文献 1 : Fornace A.J. Jr. et al., Mol. Cell Biol. 9, 4196-4203, 1989)。GADD34 は、そのカルボキシル末端部分において、単純ヘルペスウイルス 1 (HSV1) の γ_1 34.5 との間で高度に保存されたドメインを有する。この γ_1 34.5 は、HSV1 の感染した神経芽腫細胞においてタンパク質合成の成熟前での停止を遮断する病原性因子である (非特許文献 2 : Chou J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5247-5251, 1994)。 γ_1 34.5 タンパク質のカルボキシル末端ドメインは、プロテインホスファターゼ 1 α (PP1 α) に結合する。この複合体は、真核細胞翻訳開始因子 2 α (eIF2 α) を特異的に脱リン酸化し、タンパク質合成停止が防止される (非特許文献 3 : He B. et al., J. Virol. 70, 84-90, 1996)。さらに、Novoa ら (非特許文献 4 : Novoa I. et al., J. Cell Biol. 153, 1011-1022, 2001) および Kojima ら (非特許文献 5 : Kojima E. et al., FASEB J. 17, 1573-1575, 2003) では、GADD34 ノックアウトマウスを用いる実験により、GADD34 の機能の一つが HSV1 の γ_1 34.5 タンパク質の機能に類似することが示されている。特に、Kojima らの上記文献には、GADD34^{-/-}マウス胚繊維芽細胞 (MEF) において、この MEF を小胞体 (ER) ストレスに曝すと、タンパク質合成停止からの回復が遅れることが記載されている。

10

【0003】

また、GADD34 と PP1 α との関連については、次のような報告がある。まず、Trinkle-Mulcahy ら (非特許文献 6 : Trinkle-Mulcahy L et al., J. Cell Sci. 114, 4219-4228, 2001) には、内因性 PP1 α が主に培養細胞の核内に局在していることが示されている。さらに、Brush ら (非特許文献 7 : Brush M.H. et al., Mol. Cell Biol. 23, 1292-1303, 2003) には、GADD34 が PP1 α に結合すること、小胞体ストレスを誘導するツニカマイシン処理によって GADD34 遺伝子発現が増強されること、およびツニカマイシン処理によって PP1 α が小胞体に局在化することが示されている。しかしながら、DNA 傷害物質が PP1 α を小胞体に移行させることは、これまでに報告されていない。

20

【0004】

プロテインホスファターゼと p53 との関連については、次のような報告がある。Takenaka ら (非特許文献 8 : Takenaka I. et al., J. Biol. Chem. 270, 5405-5411, 1995) には、PP1/PP2A が p53 の C 末端部位 (プロテインキナーゼによるリン酸化部位) を脱リン酸化し、これにより p53 の DNA 結合能に影響を与えることが示されている。一方で、p53 の N 末端部位におけるリン酸化は、転写調節能および安定化にとって重要であるとされているが、この N 末端部位でのリン酸化とプロテインホスファターゼとの関係は解明されていない。

30

【0005】

GADD34 と細胞周期停止またはアポトーシスとの関連について、いくつかの報告がある。いくつかの研究により、電離性放射線照射またはアルキル化剤であるメチルメタンスルホネート (MMS) での処理の後に、所定の細胞系において、アポトーシスの開始が GADD34 の発現に相関することが示されている (非特許文献 9 : Adler H.T. et al., Mol. Cell Biol. 19, 7050-7060, 1999 ; 非特許文献 10 : Grishin A.V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 10172-10177, 2001)。ショウジョウバエトリソラックス (trx) 遺伝子のヒト相同体である HRX 白血病性融合癌遺伝子は、GADD34 に結合してアポトーシス応答を負に調節する (非特許文献 9 : Adler H.T. et al., Mol. Cell Biol. 19, 7050-7060, 1999)。結腸直腸癌 SW480 細胞株における GADD34 の発現は、電離性放射線照射により誘発されるアポトーシスを促進することが報告されている (非特許文献 9 : Adler H.T. et al., Mol. Cell Biol. 19, 7050-7060, 1999)。また、ヒト GADD34 は、黒色腫細胞および神経膠腫細胞の分化および増殖停止によって誘導されることが示されている (非特許文献 11 : Jiang H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9160-9165, 1996 ; 非特許文献 12 : Su Z.Z. et al., Oncogene 22, 1164-1180, 2003)。ヒト黒色腫細胞においては、IL-24 が GADD ファミリーの遺伝子発現お

40

50

およびアポトーシスを誘発すること、およびアンチセンス法による G A D D 3 4 の発現抑制によって前記アポトーシスが遮断されることが報告されている（非特許文献 1 3 : Sarkar D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 10054-10059, 2002）。

【0006】

【非特許文献 1】Fornace A.J. Jr. et al., Mol. Cell Biol. 9, 4196-4203, 1989

【非特許文献 2】Chou J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5247-5251, 1994

【非特許文献 3】He B. et al., J. Virol. 70, 84-90, 1996

【非特許文献 4】Novoa I. et al., J. Cell Biol. 153, 1011-1022, 2001

【非特許文献 5】Kojima E. et al., FASEB J. 17, 1573-1575, 2003

【非特許文献 6】Trinkle-Mulcahy L et al., J. Cell Sci. 114, 4219-4228, 2001

10

【非特許文献 7】Brush M.H. et al., Mol. Cell Biol. 23, 1292-1303, 2003

【非特許文献 8】Takenaka I. et al., J. Biol. Chem. 270, 5405-5411, 1995

【非特許文献 9】Adler H.T. et al., Mol. Cell Biol. 19, 7050-7060, 1999

【非特許文献 10】Grishin A.V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 10172-10177, 2001

【非特許文献 11】Jiang H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9160-9165, 1996

【非特許文献 12】Su Z.Z. et al., Oncogene 22, 1164-1180, 2003

【非特許文献 13】Sarkar D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 10054-10059, 2002

20

【発明の概要】

【0007】

本発明者らは、細胞の増殖またはアポトーシスの阻害について、G A D D 3 4 の機能解析を行なった。G A D D 3 4 のトランスフェクションにより、p 5 3 のリン酸化が誘導された。G A D D 3 4 欠損 M E F では、メチルメタンスルホネート（MMS）による p 5 3 のリン酸化は、野生型 M E F に比べて減少していた。G A D D 3 4 は、主に核内に存在するプロテインホスファターゼ 1 α（P P 1 α）に結合することが知られている。MMS 処理により、P P 1 α は核から小胞体に移行した。なお、MMS 処理は e I F 2 α リン酸化を刺激せず、タンパク質合成停止を誘導しないことが示された。さらに、G A D D 3 4 のトランスフェクションにより、P P 1 α が小胞体に移行した。さらに、N I H 3 T 3 細胞における T e t o n - o f f システムを用いて、細胞増殖について調べたところ、G A D D 3 4 を誘導した（テトラサイクリン無し）細胞は増殖を停止し、p 2 1 / W A F 1 の m R N A 発現量が増加した。これらの結果から、本発明者らは、G A D D 3 4 が、P P 1 α を核から細胞質中に移行させることにより p 5 3 リン酸化を促進する、との知見を得た。本発明は、この知見に基づくものである。

30

【0008】

従って、本発明は、G A D D 3 4 の作用の調節能に基づく p 5 3 タンパク質活性化調節剤のスクリーニング法、p 5 3 タンパク質の活性化法、および p 5 3 タンパク質に関連する疾患を治療するための医薬組成物を提供することを目的とする。

【0009】

40

そして、本発明によるスクリーニング法は、哺乳動物細胞内における p 5 3 タンパク質の活性化を促進または抑制する薬物を同定する方法であって、（a）G A D D 3 4 遺伝子を発現しうる細胞を、候補薬物の存在下において、該候補薬物の不在下で前記細胞が G A D D 3 4 遺伝子を発現しうる条件下にて培養する工程、および（b）工程（a）により得られる細胞において、G A D D 3 4 遺伝子発現の促進または抑制を検出する工程、を含んでなり、工程（b）において G A D D 3 4 遺伝子発現の促進が検出された場合には、その候補薬物が p 5 3 タンパク質の活性化を促進する薬物として同定され、工程（b）において G A D D 3 4 遺伝子発現の抑制が検出された場合には、その候補薬物が p 5 3 タンパク質の活性化を抑制する薬物として同定される方法である。

【0010】

50

本発明の他の態様によるスクリーニング法は、哺乳動物細胞内における p 5 3 タンパク質の活性化を促進または抑制する薬物を同定する方法であって、(a) G A D D 3 4 遺伝子および P P 1 α 遺伝子を発現しうる細胞を、候補薬物の存在下において、該候補薬物の不在下で前記細胞が G A D D 3 4 遺伝子および P P 1 α 遺伝子を発現しうる条件下にて培養する工程、ならびに (b) 工程 (a) により得られる細胞において、G A D D 3 4 タンパク質と P P 1 α との相互作用の促進または抑制を検出する工程、を含んでなり、工程 (b) において、前記相互作用の促進が検出された場合には、その候補薬物が p 5 3 タンパク質の活性化を促進する薬物として同定され、工程 (b) において、前記相互作用の抑制が検出された場合には、その候補薬物が p 5 3 タンパク質の活性化を抑制する薬物として同定される方法である。

10

【0011】

さらに、本発明による p 5 3 タンパク質活性化法は、哺乳動物細胞内における p 5 3 タンパク質の活性化を促進する方法であって、目的とする哺乳動物細胞を、G A D D 3 4 遺伝子発現促進剤を用いて処理する工程を含んでなる方法である。

【0012】

さらに、本発明による医薬組成物は、G A D D 3 4 遺伝子発現促進剤および医薬上許容される担体を含んでなる、p 5 3 タンパク質の活性化が治療上有効とされる疾患または障害を治療するための医薬組成物である。

【0013】

さらに、本発明の他の態様による医薬組成物は、G A D D 3 4 遺伝子発現抑制剤および

20

【0014】

本発明によれば、生物学的研究、医療などの様々な分野において、p 5 3 タンパク質の活性化の調節が可能となる。

【発明の具体的説明】

【0015】

本明細書において、G A D D 3 4 が、p 5 3 リン酸化、p 2 1 m R N A 発現および細胞増殖停止を誘導することが実証されている。γ線照射、UV照射またはMMS処理などのDNA損傷ストレスにより、ヒト p 5 3 のセリン15におけるリン酸化およびマウス p 5 3 のセリン18におけるリン酸化が誘導される。G A D D 3 4 欠損MEFでは、MMS処理またはUV C 処理の後における p 5 3 のセリン18でのリン酸化は、野生型MEFに比べて弱いものであった。また、G A D D 3 4 c D N A でのトランスフェクションにより、ヒト p 5 3 のセリン15におけるリン酸化が用量依存的に増加することが示された。これらの結果によれば、G A D D 3 4 により p 5 3 のリン酸化が誘導されるものと結論づけられる。さらに、本明細書においては、MMS処理によってG A D D 3 4 が誘導されること、G A D D 3 4 が小胞体において P P 1 α と相互作用し、P P 1 α の核内への移行を阻害すること、核内の P P 1 α の量が減少することにより p 5 3 の脱リン酸化が抑制され、リン酸化された p 5 3 の量が増加することが示されている。

30

【0016】

以上のような知見から、哺乳動物細胞内における p 5 3 タンパク質の活性化を促進または抑制する薬物を同定する方法が提供される。この方法により同定される薬物は、好ましくはヒト細胞内におけるヒト p 5 3 タンパク質の活性化、特にヒト p 5 3 タンパク質の第15番目のセリン残基のリン酸化による活性化、を促進または抑制するものとされる。

40

【0017】

本発明の第一の態様による薬物同定法は、G A D D 3 4 遺伝子発現を調節する能力を指標とするものであり、よって、該方法により同定される薬物は、G A D D 3 4 遺伝子発現の促進剤または抑制剤である。従って、この方法は以下の工程を含むものとされる：

(a₁) G A D D 3 4 遺伝子を発現しうる細胞を、候補薬物の存在下において、該候補薬物の不在下で前記細胞が G A D D 3 4 遺伝子を発現しうる条件下にて培養する工程；およ

50

び

(b₁) 工程 (a₁) により得られる細胞において、GADD34 遺伝子発現の促進または抑制を検出する工程。

【0018】

本発明の第一の態様による薬物同定法では、工程 (b₁) において GADD34 遺伝子発現の促進が検出された場合には、その候補薬物が p53 タンパク質の活性化を促進する薬物として同定され、工程 (b₁) において GADD34 遺伝子発現の抑制が検出された場合には、その候補薬物が p53 タンパク質の活性化を抑制する薬物として同定される。

【0019】

工程 (a₁) においては、内因性 GADD34 遺伝子を有する細胞をそのままの形で用いることができるが、内因性 GADD34 遺伝子の有無にかかわらず、GADD34 遺伝子を発現するように遺伝子操作された細胞を用いてもよい。GADD34 タンパク質のアミノ酸配列およびこれをコードするヌクレオチド配列は当技術分野において周知であり、例えば、配列番号 1 および配列番号 2 (NCBI アクセス番号: U83981) に示されるヒト GADD34 の配列が挙げられる。当業者であれば、これらの配列を参照することにより、標準的な方法 (例えば、Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) を参照のこと) を用いて、細胞を適切にトランスフェクトすることができる。

【0020】

本発明の好ましい実施態様によれば、工程 (a₁) において用いられる細胞は哺乳動物細胞とされる。このような哺乳動物細胞としては、様々なものが当技術分野において知られており、例えば、COS-7 細胞、C127 細胞、NIH3T3 細胞、CHO 細胞、HEK293 細胞、HeLa 細胞、BHK 細胞、SOAS-2 細胞等が挙げられる。また、哺乳動物細胞において用いられる発現ベクターは、例えば、複製起点、プロモーター、エンハンサー、リボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与部位、スプライス受容部位、ターミネーター、5' 非翻訳領域等を適宜含んでなるものである。

【0021】

工程 (a₁) における培養は、当技術分野において周知の標準的な方法、例えば、候補薬物と前記細胞とをインキュベートすることによって行なうことができる。また、候補薬物の不在下で前記細胞が GADD34 遺伝子を発現しうる条件は、γ 線照射、UV 照射、MMS 処理などの技術を用いて DNA 損傷ストレスを与えることによって達成することができ、あるいは、トランスフェクションに用いた発現ベクター中のプロモーターを活性化することによって達成することもできる。培養における培地、温度、時間、候補薬物の量、細胞の量、添加物などは、当業者であれば適切に選択することができる。

【0022】

工程 (b₁) において、GADD34 遺伝子発現の促進または抑制は、当技術分野において周知の標準的な方法、例えば、該遺伝子の発現の強度を測定することによって検出することができる。細胞内の遺伝子発現の強度を測定する方法としては、その発現産物、例えば mRNA またはタンパク質、の量を測定する方法が挙げられる。さらに、GADD34 の mRNA 量は、これに特異的なプライマーペアを用いる RT-PCR による増幅の後に電気泳動を行なう方法等により測定することができる。また、GADD34 タンパク質の量は、細胞から得られるタンパク質抽出物を電気泳動した後に GADD34 に特異的な抗体を用いてこれを検出するイムノブロット法等により測定することができる。さらに、本発明の好ましい実施態様によれば、工程 (b₁) は、工程 (a₁) により得られる細胞における GADD34 遺伝子発現の強度と、候補化合物の不在下で培養された対照細胞における GADD34 遺伝子発現の強度とを比較することを含んでなる。対照細胞は、候補薬物を添加しないことを除き、工程 (a₁) と同一の方法によって得ることができる。

【0023】

本発明の第二の態様による薬物同定法は、GADD34 タンパク質と PP1α との相互作用を調節する能力を指標とするものであり、よって、該方法により同定される薬物は、

前記相互作用の促進剤または抑制剤である。従って、この方法は以下の工程を含むものとされる：

(a₂) GADD34 遺伝子および PP1 α 遺伝子を発現しうる細胞を、候補薬物の存在下において、該候補薬物の不在下で前記細胞が GADD34 遺伝子および PP1 α 遺伝子を発現しうる条件下にて培養する工程、ならびに、

(b₂) 工程 (a₂) により得られる細胞において、GADD34 タンパク質と PP1 α との相互作用の促進または抑制を検出する工程。

【0024】

本発明の第二の態様による薬物同定法では、工程 (b₂) において、前記相互作用の促進が検出された場合には、その候補薬物が p53 タンパク質の活性化を促進する薬物として同定され、工程 (b₂) において、前記相互作用の抑制が検出された場合には、その候補薬物が p53 タンパク質の活性化を抑制する薬物として同定される。

【0025】

工程 (a₂) においては、内因性 GADD34 遺伝子および内因性 PP1 α 遺伝子を有する細胞をそのままの形で用いることができるが、これら内因性遺伝子の有無にかかわらず、GADD34 遺伝子および／または PP1 α 遺伝子を発現するように遺伝子操作された細胞を用いてもよい。GADD34 タンパク質のアミノ酸配列およびこれをコードするヌクレオチド配列は当技術分野において周知であり、例えば、配列番号 1 および配列番号 2 (NCBI アクセス番号：U83981) に示されるヒト GADD34 の配列が挙げられる。また、PP1 α タンパク質のアミノ酸配列およびこれをコードするヌクレオチド配列は当技術分野において周知であり、例えば、配列番号 3 および配列番号 4 (NCBI アクセス番号：X70848) に示されるヒト PP1 α の配列が挙げられる。当業者であれば、これらの配列を参照することにより、標準的な方法 (例えば、Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) を参照のこと) を用いて、細胞を適切にトランスフェクトすることができる。

【0026】

本発明の好ましい実施態様によれば、工程 (a₂) において用いられる細胞は哺乳動物細胞とされる。このような哺乳動物細胞としては、様々なものが当技術分野において知られており、例えば、COS-7 細胞、C127 細胞、NIH3T3 細胞、CHO 細胞、HEK293 細胞、HeLa 細胞、BHK 細胞、SOAS-2 細胞等が挙げられる。また、哺乳動物細胞において用いられる発現ベクターは、例えば、複製起点、プロモーター、エンハンサー、リボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与部位、スプライス受容部位、ターミネーター、5' 非翻訳領域等を適宜含んでなるものである。

【0027】

工程 (a₂) における培養は、当技術分野において周知の標準的な方法、例えば、候補薬物と前記細胞とをインキュベートすることによって行なうことができる。また、候補薬物の不在下で前記細胞が GADD34 遺伝子および PP1 α 遺伝子を発現しうる条件は、 γ 線照射、UV 照射、MMS 処理などの技術を用いて DNA 損傷ストレスを与えることによって達成することができ、あるいは、トランスフェクションに用いた発現ベクター中のプロモーターを活性化することによって達成することもできる。培養における培地、温度、時間、候補薬物の量、細胞の量、添加物などは、当業者であれば適切に選択することができる。

【0028】

工程 (b₂) において、GADD34 タンパク質と PP1 α との相互作用の促進または抑制は、当技術分野において周知の標準的な方法、例えば、該相互作用の強度を測定することによって検出することができる。GADD34 タンパク質と PP1 α との相互作用、すなわちこれらの結合により、核内の PP1 α タンパク質の量は減少し、一方で、細胞質中の PP1 α タンパク質の量は増加する。従って、GADD34 タンパク質と PP1 α との相互作用の強度を測定する方法としては、核内または細胞質中の PP1 α タンパク質の

量を測定する方法が挙げられる。この場合において、核内のPP1 α タンパク質量の減少は前記相互作用の促進を示し、一方で、核内のPP1 α タンパク質量の増加は前記相互作用の抑制を示す。また、細胞質中のPP1 α タンパク質量の増加は前記相互作用の促進を示し、細胞質中のPP1 α タンパク質量の減少は前記相互作用の抑制を示す。さらに、核内または細胞質中のPP1 α タンパク質量は、当技術分野において周知の細胞分画法によって核内のタンパク質画分または細胞質中のタンパク質画分を得た後に、これを電気泳動し、その後、PP1 α に特異的な抗体を用いてこれを検出するイムノブロット法等により測定することができる。さらに、本発明の好ましい実施態様によれば、工程(b₂)は、工程(a₂)により得られる細胞における前記相互作用の強度と、候補化合物の不在下で培養された対照細胞における前記相互作用の強度とを比較することを含んでなる。対照細胞は、候補薬物を添加しないことを除き、工程(a₂)と同一の方法によって得ることができる。

10

【0029】

GADD34遺伝子発現促進剤およびGADD34-PP1 α 相互作用促進剤は、哺乳動物細胞内におけるp53タンパク質の活性化を促進することができる。従って、本発明によれば、哺乳動物細胞内におけるp53タンパク質の活性化を促進する方法であって、目的とする哺乳動物細胞を、GADD34遺伝子発現促進剤またはGADD34-PP1 α 相互作用促進剤を用いて処理する工程を含んでなる方法が提供される。さらに、本発明によれば、p53タンパク質の活性化が治療上有効とされる疾患または障害を治療するための、GADD34遺伝子発現促進剤またはGADD34-PP1 α 相互作用促進剤の使用が提供される。さらに、本発明によれば、治療上有効な量のGADD34遺伝子発現促進剤またはGADD34-PP1 α 相互作用促進剤を被検者に投与することを含んでなる、p53タンパク質の活性化が治療上有効とされる疾患または障害を治療または予防する方法が提供される。さらに、本発明によれば、p53タンパク質の活性化が治療上有効とされる疾患または障害を治療するための薬剤の製造における、GADD34遺伝子発現促進剤またはGADD34-PP1 α 相互作用促進剤の使用が提供される。

20

【0030】

p53タンパク質の活性化が治療上有効とされる疾患または障害は特に制限されるものではないが、好ましくは癌または腫瘍とされる。また、治療または予防の対象となる被検者は、好ましくは哺乳動物、例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物とされる。

30

【0031】

GADD34遺伝子発現促進剤は、本発明の第一の態様による薬物同定法によって同定することができる。また、GADD34-PP1 α 相互作用促進剤は、本発明の第二の態様による薬物同定法によって同定することができる。

【0032】

本発明の好ましい実施態様によれば、前記GADD34遺伝子発現促進剤は、GADD34をコードするDNAを含んでなる発現ベクターとされる。このような発現ベクターは、配列番号1に示されるヌクレオチド配列などを参照して、当技術分野において周知の標準的な技術によって製造することができる。また、前記発現ベクターは、例えば、複製起点、プロモーター、エンハンサー、リボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与部位、スプライス受容部位、ターミネーター、5'非翻訳領域等を適宜含んでなることができる。さらに、前記発現ベクターとしては、ウイルスベクター、例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター等を用いることもできる。

40

【0033】

GADD34遺伝子発現抑制剤およびGADD34-PP1 α 相互作用抑制剤は、哺乳動物細胞内におけるp53タンパク質の活性化を抑制することができる。従って、本発明によれば、哺乳動物細胞内におけるp53タンパク質の活性化を抑制する方法であって、目的とする哺乳動物細胞を、GADD34遺伝子発現抑制剤またはGADD34-PP1 α 相互作用抑制剤を用いて処理する工程を含んでなる方法が提供される。さらに、本発明

50

によれば、p 5 3 タンパク質の活性化の阻害が治療上有効とされる疾患または障害を治療するための、G A D D 3 4 遺伝子発現抑制剤またはG A D D 3 4 - P P 1 α 相互作用抑制剤の使用が提供される。さらに、本発明によれば、治療上有効な量のG A D D 3 4 遺伝子発現抑制剤またはG A D D 3 4 - P P 1 α 相互作用抑制剤を被検者に投与することを含んでなる、p 5 3 タンパク質の活性化の阻害が治療上有効とされる疾患または障害を治療または予防する方法が提供される。さらに、本発明によれば、p 5 3 タンパク質の活性化の阻害が治療上有効とされる疾患または障害を治療するための薬剤の製造における、G A D D 3 4 遺伝子発現抑制剤またはG A D D 3 4 - P P 1 α 相互作用抑制剤の使用が提供される。

【0034】

10

p 5 3 タンパク質の活性化の阻害が治療上有効とされる疾患または障害は特に制限されるものではないが、好ましくは炎症性疾患、例えば慢性関節リウマチとされる。また、治療または予防の対象となる被検者は、好ましくは哺乳動物、例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物とされる。

【0035】

G A D D 3 4 遺伝子発現抑制剤は、本発明の第一の態様による薬物同定法によって同定することができる。また、G A D D 3 4 - P P 1 α 相互作用抑制剤は、本発明の第二の態様による薬物同定法によって同定することができる。

【0036】

本発明の好ましい実施態様によれば、前記G A D D 3 4 遺伝子発現抑制剤は、G A D D 3 4 遺伝子の発現を特異的に抑制するアンチセンス核酸分子とされる。アンチセンス法は、特定の遺伝子の発現を抑制するための周知の技術である。一つの具体例では、前記アンチセンス核酸分子は、G A D D 3 4 遺伝子の5' コード領域の配列に基づいて設計された、約10~40塩基長のアンチセンスRNAとされる。他の具体例では、前記アンチセンス核酸分子は、G A D D 3 4 遺伝子の転写に関与する領域の配列に相補的となるように設計されたDNAオリゴヌクレオチドとされる。このようなアンチセンス核酸分子は、配列番号1に示されるようなG A D D 3 4 遺伝子の配列に基づいて、容易に設計することができる。

20

【0037】

本発明の好ましい実施態様によれば、前記G A D D 3 4 遺伝子発現抑制剤は、G A D D 3 4 遺伝子の発現を特異的に抑制するs i R N A 核酸分子とされる。本明細書において、「s i R N A 核酸分子」とは、s i R N A そのものだけでなく、標的細胞中にs i R N A を導入しうる、より長い二本鎖RNA分子をも意味する。s i R N A 核酸分子は、RNA干渉(RNAi)によって特定遺伝子の発現を抑制することができる、周知のツールである(Elbashir, S.M. et al., Nature 411, 494-498, 2001)。s i R N A は、典型的には、標的遺伝子のmRNAに特異的な配列に相同な、19~21塩基対のヌクレオチド配列を含んでなる。上記の二本鎖RNA分子は、典型的には、標的遺伝子のmRNAに特異的な配列に相同な、より長いヌクレオチド配列を含んでなる。このようなs i R N A 核酸分子は、配列番号1に示されるようなG A D D 3 4 遺伝子の配列に基づいて、容易に設計することができる。さらに、前記s i R N A 核酸分子は、細胞中に送達された適切なベクターによって発現させることもできる。従って、前記G A D D 3 4 遺伝子発現抑制剤は、G A D D 3 4 遺伝子の発現を特異的に抑制するs i R N A 核酸分子を発現するベクターとしてもよい。このようなベクターは、当技術分野において周知の標準的な手順により、容易に構築することができる(Bass, B.L., Cell 101, 235-238, 2000; Tavernarakis, N. et al., Nat. Genet. 24, 180-183, 2000; Malagon, F. et al., Mol. Gen. Genet. 259, 639-644, 1998; Parrish, S. et al., Mol. Cell 6, 1077-1087, 2000)。

30

40

【0038】

G A D D 3 4 遺伝子発現促進剤、G A D D 3 4 - P P 1 α 相互作用促進剤、G A D D 3 4 遺伝子発現抑制剤およびG A D D 3 4 - P P 1 α 相互作用抑制剤は、局所、静脈内、皮下、筋肉内、経口、直腸、粘膜など、治療または予防しようとする疾患または障害に応じ

50

て適切な経路で投与することができる。また、これらの治療上の有効量は、症状の重篤度、被検者の年齢、用いられる具体的な薬物の有効性、投与経路、投与の頻度などに従って、医師または獣医によって適宜決定される。一般的には、前記治療上有効量は、一日当たり、約0.001～約1000mg/体重kg、好ましくは約0.01～約10mg/体重kg、より好ましくは約0.01～約1mg/体重kgである。

【0039】

GADD34遺伝子発現促進剤、GADD34-PP1 α 相互作用促進剤、GADD34遺伝子発現抑制剤およびGADD34-PP1 α 相互作用抑制剤は、医薬上許容される担体とともに投与することができる。従って、本発明によれば、GADD34遺伝子発現促進剤またはGADD34-PP1 α 相互作用促進剤、および医薬上許容される担体を含んでなる、医薬組成物が提供され、該医薬組成物は、p53タンパク質の活性化が治療上有効とされる疾患または障害を治療するために用いることができる。さらに、本発明によれば、GADD34遺伝子発現抑制剤またはGADD34-PP1 α 相互作用抑制剤、および医薬上許容される担体を含んでなる医薬組成物が提供され、該医薬組成物は、p53タンパク質の活性化の阻害が治療上有効とされる疾患または障害を治療するために用いることができる。医薬上許容される担体、例えば、ベヒクル、賦形剤、希釈剤等は、投与経路、用いられる具体的な薬物の性質などに応じて、当業者により適宜選択される。本発明による医薬組成物は、好ましくは、治療上有効量のGADD34遺伝子発現促進剤、GADD34-PP1 α 相互作用促進剤、GADD34遺伝子発現抑制剤またはGADD34-PP1 α 相互作用抑制剤、ならびに医薬上許容される担体を含んでなるものとされる。

【実施例】

【0040】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

【0041】

例1：GADD34とp53のリン酸化との関連

1. 材料および方法

細胞培養および試薬

NIH3T3細胞は、American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) から入手し、10%ウシ胎児血清 (GIBCO) を補充したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM, Sigma) 中、5%CO₂を含む加湿雰囲気下、37℃で維持した。SOAS-2細胞は、理研バイオリソースセンター (RIKEN BioResource Center, Ibaraki, Japan) から購入し、10%ウシ胎児血清 (GIBCO) を補充したマッコイ5A培地 (GIBCO) 中で増殖させた。UV-C照射のために、細胞をPBSで洗浄し、その後、FUNA UV LINKER Fs1500 (Funakoshi, Tokyo, Japan) を用いて培地の不在下で照射した。MMSおよびテトラサイクリンは、Sigma-Aldrichから購入した。シクロヘキサミドはCalbiochemから購入した。

【0042】

GADD34誘導可能細胞系の樹立および細胞培養

GADD34 t e t - o f f 誘導可能細胞系を樹立するため、NIH3T3細胞を、tTA調節タンパク質を発現するpT e t - o f f プラスミド (Clontech, Palo Alto, CA) でトランスフェクトし、G418耐性コロニーを選択して増殖させた。次いで、tTAタンパク質を発現する細胞を、pTREプラスミド (Clontech) のBamHI/HindIII部位中にGADD34遺伝子を挿入することにより調製したpTRE-GADD34構築物でさらにトランスフェクトした。pTRE-GADD34プラスミドでトランスフェクトされた細胞を21日間のハイグロマイシン (200 μ g/ml) 処理により選択し、各ハイグロマイシン耐性コロニーを別々に回収し、それぞれについてt e t - o f f システムによるGADD34タンパク質発現の検出を行なった。GADD34誘導可能細胞を、10%ウシ胎児血清 (GIBCO) を補充したDMEM培地中において、2 μ g/mlのテトラサイクリンの存在下で増殖させた。GADD34タンパク質の発現を誘導するため、テトラサイクリンを含むDMEM培地を除去し、プレートをPBSで2回洗浄

し、その後、テトラサイクリンを含まない新鮮なDMEM培地を細胞に加えた。GADD34タンパク質の誘導について調べるために、所定の時点で細胞を回収した。

【0043】

一過性トランスフェクション

SOAS-2細胞を6ウェルプレート上に 1×10^6 細胞/ウェルの密度で播種した。この細胞を、Effectene Transfection Reagent (Qiagen)を用いて、 100 ng /ウェルのプラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、細胞をPBSで2回洗浄し、溶解緩衝液で溶解した。

【0044】

マウス胚繊維芽細胞の調製

GADD34欠損マウスおよび野生型マウスに由来するマウス胚繊維芽細胞(MEF)を、14.5日齢の胎児から調製した。全ての培養物は、10%ウシ胎児血清(FCS)を補充したダルベッコ改変必須培地(Sigma)中で維持した。予備培養および実験のために、細胞を 2×10^6 細胞/ 10 cm プレートの密度で播種した。

【0045】

イムノブロット分析

溶解緩衝液(20 mM HEPES ($\text{pH} 7.5$)、 1% Triton X-100、 150 mM NaCl、 10% グリセロール、および 1 mM EDTA、ならびに 1 mM フェニルメタンスルホニルフルオリド(PMSF)、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ロイペプチン、および $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ペプスタチン)を用いて、細胞を皿から取り出した。得られた抽出物を、 $120,000 \times g$ 、 4°C で15分間遠心分離し、上清をサンプリング緩衝液(100 mM Tris-HCl ($\text{pH} 6.8$)、 4% SDS、 20% グリセロール、 150 mM 2-メルカプトエタノール、および 1% ブロモフェノールブルー)中で5分間煮沸した。約 $20 \mu\text{g}$ のタンパク質を9%または12%のSDS/PAGE上で電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。得られたプロットを、5%スキムミルクを含有するPBST(0.05% Tween 20を補充した $1 \times \text{PBST}$)で1時間ブロッキングし、一次抗体とともに室温で6時間または 4°C で一晩インキュベートし、3回洗浄した後に、HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)に結合した二次抗体とともにインキュベートした。タンパク質は、化学発光ECLキット(Amersham)により、次の抗体のいずれかを用いて検出した:抗ホスホp53(Ser15)抗体(#9284, Cell Signaling Technology)、抗ホスホEIF2 α (Ser52)抗体(44-728, BIOSOURCE international)、抗EIF2 α 抗体(sc7629, C-20)、抗PP1 α 抗体(sc-6104, C-19)、および抗GADD34抗体(sc-825, C-19, Santa Cruz)。

【0046】

細胞分画

既知の方法に従って、細胞質抽出物および核抽出物を得た。概説すると、細胞をトリプシン処理し、PBSTですすぎ、プロテアーゼ阻害剤($1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ロイペプチン、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ アプロチニン、および 0.5 mM フェニルメタンスルホニルフルオリド)を補充した $200 \mu\text{l}$ の緩衝液A(10 mM HEPES ($\text{pH} 7.9$)、 10 mM KCl、 1.5 mM MgCl₂)中において、氷上でインキュベートした。細胞質抽出物を得るため、 2.5% Nonidet P-40 plusプロテアーゼ阻害剤を含有する $25 \mu\text{l}$ の緩衝液Aの添加によって細胞を溶解した。核をペレット化($3,500 \text{ rpm}$ 、 4°C 、4分間)し、上清を回収し、この上清を5回凍結融解した後に遠心分離($3,500 \text{ rpm}$ 、 4°C 、10分間)した。核画分を調製するため、プロテアーゼ阻害剤を補充した抽出緩衝液C(20 mM HEPES ($\text{pH} 7.9$)、 0.45 M NaCl、 1 mM EDTA)中で核ペレットをインキュベートし、遠心分離($14,000 \text{ rpm}$ 、 4°C 、10分間)を行ない、上清を回収した。全細胞溶解物は、上述のように調製した。

【0047】

免疫組織化学実験

細胞を、ポリ-D-リシンでコーティングされたガラスカバー片上に播種した。24時

10

20

30

40

50

間後、MMSを最終濃度 $80\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加し、カバー片を8時間インキュベートした。細胞をPBSで洗浄し、4% (w/v) パラホルムアルデヒドを含有するPBS中で10分間固定化し、0.2% (w/v) Triton X-100を含有するPBS中で5分間浸透化した。次いで、得られた細胞を、2% (w/v) ウシ血清アルブミン (BSA) を含有するPBSを用いて、1時間ブロッキングした。免疫検出は、一次抗体 (1:100希釈) と、フルオレセイン結合型二次抗体および/またはローダミン結合型二次抗体 (1:200希釈) とを用いて行なった。タンパク質は、次の抗体のうちの一つまたは二つを用いて検出した: 抗myc抗体 (Invitrogen)、抗PP1 α 抗体 (sc-6104, C-19)、ウシ抗ヤギ抗体ローダミン結合体 (sc-2349, Santa Cruz)、およびウサギ抗マウス抗体フルオレセイン結合体 (DAKO)。 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ のヨウ化プロピディウム (PI) 染色剤を用いて核 (DNA) を染色し、カバー片をガラススライド上に置いた。

10

【0048】

統計解析

データは平均値±標準偏差として示した。グループ間の統計学的有意差は、two-way repeated-measures ANOVAによって評価した。 $p < 0.05$ の場合に、有意差があるものとした。

【0049】

2. 実験および結果

DNA損傷により誘導されるp53リン酸化のGADD34による増強

p53とGADD34の関連を分析するため、SOAS-2細胞 (p53を有さない細胞系) を、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ または $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ のテトラサイクリンを補充したDMEM培地中で培養し、変異型p53 (143A) の発現プラスミドでトランスフェクトし、さらに、pTRE-GADD34ベクターおよびpTet-offベクターで同時トランスフェクトした。トランスフェクションの12時間後、テトラサイクリンを除いた。トランスフェクションの36時間後に、細胞を冷却したPBSで2回洗浄した。全細胞抽出物を調製し、p53タンパク質のリン酸化のレベルをイムノブロットニングによって決定した。その結果を図1に示す。図1によれば、GADD34の過剰発現により、用量依存的にp53リン酸化が促進されることが示される。

20

【0050】

次いで、GADD34がin vivoにおいてp53リン酸化を促進するか否かを調べるため、GADD34欠損マウス胚繊維芽細胞 (MEF) におけるp53タンパク質発現およびp53リン酸化の分析を行なった。細胞を濃度 $80\mu\text{g}/\text{ml}$ のMMSで処理した後、所定の時点でタンパク質溶解物を調製した。 $50\mu\text{g}$ の全タンパク質サンプルを12% SDS-PAGEによって電気泳動し、PVD膜に転写し、上述した各種抗体を用いて染色した。結果を図2に示す。図2によれば、GADD34欠損MEFにおけるMMS処理後12時間の時点でのp53およびホスホセリン18p53の発現レベルは、野生型MEFに比べて低いことが示される。

30

【0051】

MMS処理後におけるGADD34によるプロテインホスファターゼ1 α (PP1 α) の小胞体への移行

40

GADD34がp53リン酸化を促進する際の作用機序を明らかにするため、GADD34に結合するPP1 α の挙動を調べた。

【0052】

まず、NIH3T3細胞をパラホルムアルデヒド中で固定化し、PIでの染色および抗PP1 α 抗体での染色を行ない、それぞれを顕微鏡で観察した。さらに、これらの画像を重ね合わせた。実験は、それぞれ少なくとも2回ずつ行なった。その結果、MMSで刺激していないNIH3T3細胞では、PP1 α は、細胞質よりも核内に多く存在することが示された。

【0053】

次いで、NIH3T3細胞をMMSで処理し、パラホルムアルデヒド中で固定化した後

50

、P P 1での染色および抗P P 1 α 抗体での染色を行ない、それぞれを顕微鏡で観察した。さらに、これらの画像を重ね合わせた。実験は、それぞれ少なくとも2回ずつ行なった。その結果、M M S刺激により、高密度のP P 1 α が細胞質の特定の部分に存在することが示された。

【0054】

G A D D 3 4タンパク質に特異的な抗体が免疫染色に利用できないため、M y cタグを有するG A D D 3 4を発現する発現ベクターをN I H 3 T 3細胞株にトランスフェクトした。完全長G A D D 3 4-m y cタグを発現するN I H 3 T 3細胞に対して、抗P P 1 α 抗体および抗m y c抗体での二重免疫染色を行なった。これらの細胞を、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。実験は、それぞれ少なくとも2回ずつ行なった。その結果、P P 1 α およびG A D D 3 4の両方が、主に細胞質中の特定の部分に存在することが示された。さらに、D i O C₆ (3) (ヨウ化3, 3'-ジヘキシルオキサカルボシアニン)染色を行なったところ、G A D D 3 4およびP P 1 α は小胞体中に共存していることが示された。

【0055】

以上に示される結果をさらに確認するため、核および細胞質中のP P 1 α の量をウェスタンブロッティングにより分析した。

【0056】

まず、N I H 3 T 3細胞を90 μ g/mlのM M Sで処理した。M M S処理の2~12時間後に、細胞溶解物、細胞質抽出物および核抽出物を回収した。これらのサンプルをS D S-P A G E用ゲル上で電気泳動し、抗G A D D 3 4抗体または抗P P 1 α 抗体でブロッティングした。結果を図3に示す。図3によれば、M M S処理の8時間後において、細胞質中のP P 1 α の量が増加するのに対し、核内のP P 1 α の量が減少することが示される。また、N I H 3 T 3細胞中のP P 1 α の総量は、M M S処理によって変化しないことが示される。

【0057】

次いで、G A D D 3 4^{+/+} M E FおよびG A D D 3 4^{-/-} M E Fを90 μ g/mlのM M Sで処理した。M M S処理の8時間後に、核抽出物を回収した。これらのサンプルをS D S-P A G E用ゲル上で電気泳動し、抗P P 1 α 抗体でブロッティングした。結果を図4に示す。図4によれば、G A D D 3 4欠損M E FではM M S処理によって核内P P 1 α 量が増加するのに対し、野生型M E FではM M S処理によって核内P P 1 α 量が減少することが示される。

【0058】

P P 1阻害剤であるオカダ酸によるストレス誘導性p 5 3リン酸化の増強およびp 5 3タンパク質分解の阻害

既報の研究により、化学的P P 1阻害剤であるオカダ酸はp 5 3のリン酸化の状態に影響を与えるが、通常の条件下ではp 5 3のセリン18は変化しないことが示されている (Merrick B.A. et al., Biochemistry 40, 4053-4066, 2001)。しかし、ストレス条件下においてp 5 3のリン酸化に変化が見られるか否かについては、これまでに報告されていない。p 5 3リン酸化とP P 1 α との関連を調べるため、オカダ酸の存在下および不在下でのp 5 3のセリン18におけるリン酸化の量を比較した。まず、N I H 3 T 3細胞を、60 mm培養皿中に1 \times 10⁶細胞/ウェルの密度で播種した。24時間増殖させた後、これらの細胞をU V C (50 J/m²)に曝し、照射後4時間の時点で、シクロヘキサミド (10 μ g/ml)を添加して新たなp 5 3タンパク質合成を阻害した。シクロヘキサミド処理の後、所定の時点において細胞を回収し、セリン18においてリン酸化されたp 5 3のレベルを決定した。その結果を図5に示す。図5によれば、N I H 3 T 3細胞において、U V処理によりp 5 3リン酸化が誘導されることが示される。U V処理によるp 5 3リン酸化のレベルは、オカダ酸処理によって明らかに促進されていた。また、興味深いことに、オカダ酸で処理した場合には、シクロヘキサミド処理を行なった後においてもp 5 3リン酸化のレベルが減少しなかった (例えば、シクロヘキサミド処理後15分および30分の時点でデータの参照のこと)。

【0059】

GADD34の発現誘導による細胞増殖の抑制

GADD34が細胞増殖を抑制するかどうかを調べるため、GADD34タンパク質の発現がテトラサイクリン誘導システムによって制御されるテトラサイクリン調節GADD34誘導可能細胞系を樹立した。この実験では、上述の方法に従って樹立したNIH3T3-GADD34誘導可能細胞系を用いた。

【0060】

まず、細胞を100mm培養皿中に 4×10^5 細胞の密度で播種し、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ のテトラサイクリンを含有するDMEM培地中で増殖させた。テトラサイクリンを除いた後、所定の時点において細胞を回収し、細胞内タンパク質を調製した。 $100 \mu\text{g}$ の全細胞タンパク質を用いて、抗GADD34抗体によるイムノブロッティング分析を行なった。その結果を図6に示す。図6によれば、GADD34誘導可能細胞は、テトラサイクリンの存在下では低レベルの内因性GADD34タンパク質を示すのに対し、テトラサイクリンを除いた後は、GADD34タンパク質が3倍以上に誘導されることが示される。

【0061】

次いで、完全長GADD34タンパク質を発現するTet-off GADD34細胞系をパラホルムアルデヒド中で固定化し、抗PP1 α 抗体による免疫染色およびPI染色を行なった。これらの細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。さらに、免疫染色およびPI染色の画像を重ね合わせた。実験は、それぞれ少なくとも2回ずつ行なった。その結果、テトラサイクリンの存在下（GADD34が誘導されない条件下）では、核内のPP1 α の量は細胞質における量に等しかったが、テトラサイクリンを除いた後（GADD34が誘導される条件下）では、高密度のPP1 α が細胞質の特定の部分に見られた。

【0062】

次いで、GADD34の細胞増殖に関連する機能を調べた。まず、 3×10^4 個のNIH3T3-GADD34誘導可能細胞を60mm培養皿中に播種し、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ のテトラサイクリンを含有するDMEM培地またはテトラサイクリンを含まないDMEM培地中で増殖させた。細胞数を3日間にわたって毎日数えた。その結果を図7aに示す。また、対照サンプルとして、上記の細胞に代えてNIH3T3-ルシフェラーゼ誘導可能細胞を用いて行なった実験の結果を図7bに示す。図7aおよび図7bでは、3回の実験による平均値 \pm 標準偏差としてデータを示している。図7によれば、GADD34を誘導しない条件下（テトラサイクリンの存在下）に置いた細胞が72時間で1.5倍に増殖したのに対し、GADD34を誘導する条件下（テトラサイクリンの不在下）に置いた細胞は増殖しなかったことが示されている。これに対し、対照実験においては、ルシフェラーゼを誘導しない条件下（テトラサイクリンの存在下）に置いた細胞とこれを誘導する条件下（テトラサイクリンの不在下）に置いた細胞との間で、細胞増殖の程度は相違しなかった。

【0063】

以上の実験結果から、GADD34を誘導した細胞は細胞増殖能を失うものと結論づけられる。そこで、GADD34のp21mRNA発現に対する影響を調べるため、GADD34誘導細胞を用いてRT-PCR分析を行なった。まず、GADD34誘導可能細胞を、60mm培養皿中に播種し、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ のテトラサイクリンを含有するDMEM培地中に置いた。24時間後、テトラサイクリンを除いて、細胞を48時間培養した。全RNAを抽出し、p21mRNAおよび β アクチンmRNAのそれぞれについてRT-PCRを行なった。その結果を図8に示す。図8において、1はGADD34 Tet-on細胞を示し、2はGADD34 Tet-off細胞を示し、3はルシフェラーゼTet-on細胞を示し、4はルシフェラーゼTet-off細胞を示す。また、サイクル数は、RT-PCRにおけるサイクル数を示す。図8によれば、GADD34を誘導した細胞におけるp21mRNAの発現は、GADD34を誘導しなかった細胞よりも強いことが示されている。また、対照実験において、GADD34は、ハウスキーピング遺伝子である β アクチンのmRNAの蓄積に影響しないことが示されている。

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1】図1は、GADD34の発現量とp53のリン酸化との関係を示す図である。

【図2】図2は、MMS処理後の野生型マウス胚繊維芽細胞およびGADD34欠損マウス胚繊維芽細胞におけるp53タンパク質レベルおよびホスホp53タンパク質レベルを示す図である。

【図3】図3は、MMS処理による、核内および細胞質中のPP1 α の量の経時変化を示す図である。

【図4】図4は、MMS処理後8時間の時点における、GADD34欠損マウス胚繊維芽細胞および野生型マウス胚繊維芽細胞の核内PP1 α の量を示す図である。

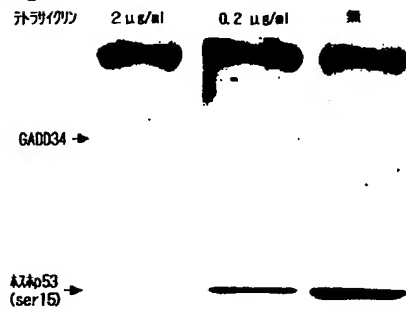
【図5】図5は、オカダ酸による、ストレスにより誘導されるp53リン酸化の増強、およびp53タンパク質分解の阻害を示す図である。 10

【図6】図6は、GADD34誘導可能3T3細胞における、テトラサイクリンの不在下でのGADD34の誘導を示す図である。

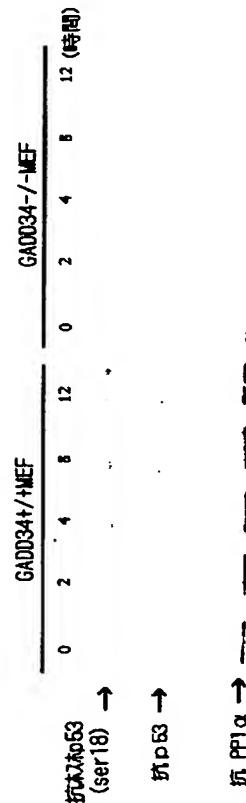
【図7】図7は、GADD34を誘導した細胞とGADD34を誘導しなかった細胞との間の、細胞増殖能の相違を示す図である。

【図8】図8は、GADD34の誘導によるp21タンパク質の増加を示す図である。

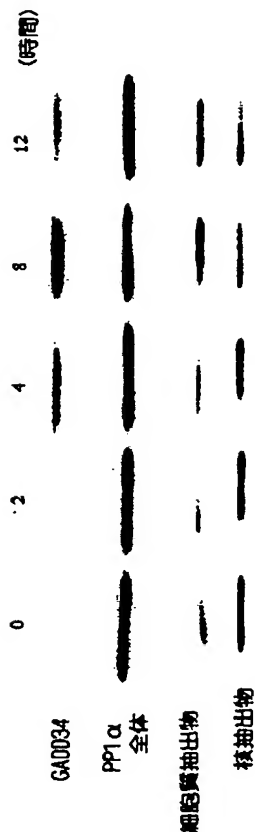
【図1】



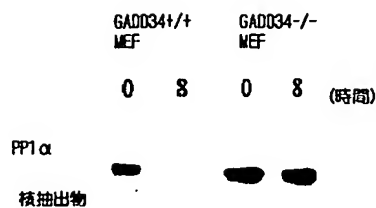
【図2】



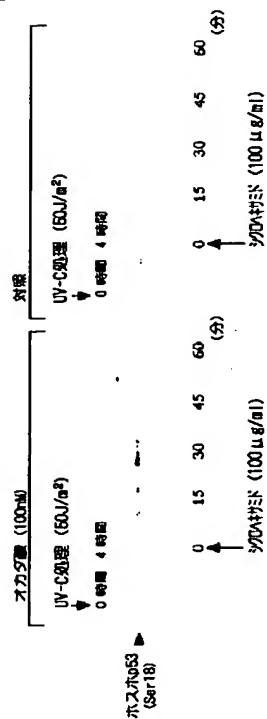
【 図 3 】



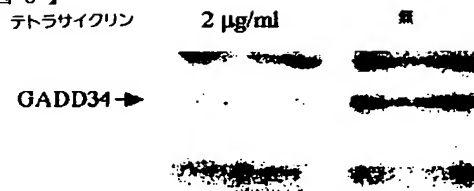
【图 4】



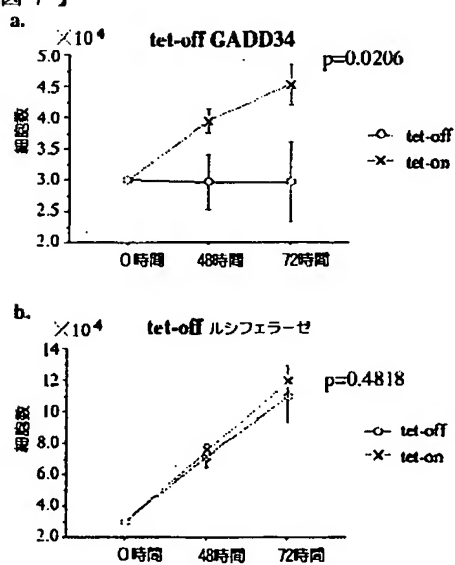
【图 5】



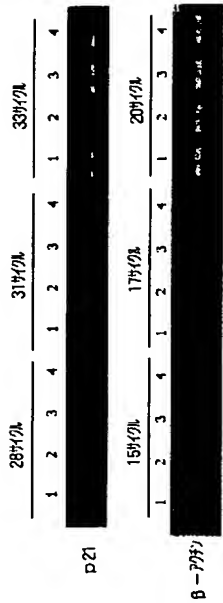
【图 6】



【图 7】



【図 8】



【配列表】

2005130744000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

A 6 1 K 48/00
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 43/00
 C 1 2 Q 1/02
 G 0 1 N 33/15
 G 0 1 N 33/50
 G 0 1 N 33/566
 // C 1 2 N 15/09

F I

A 6 1 K 48/00
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 29/00 1 0 1
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 43/00 1 1 1
 C 1 2 Q 1/02
 G 0 1 N 33/15 Z
 G 0 1 N 33/50 Z
 G 0 1 N 33/566
 C 1 2 N 15/00 A

テーマコード (参考)

4 C 0 8 7

(72)発明者 羽根田 正 隆

愛知県大府市森岡町源吾 3 6 - 3 国立療養所中部病院長寿医療研究センター内

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 FB03
 4B024 AA01 AA11 CA02 DA02 EA02 HA17
 4B063 QA01 QA05 QA11 QQ08 QQ53 QQ79 QR32 QR59 QR77 QR80
 4C084 AA13 AA17 NA14 ZB112 ZB152 ZB262 ZC022
 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB11 ZB15
 ZB26 ZC02
 4C087 AA01 AA02 AA03 BC83 CA12 NA14 ZB11 ZB15 ZB26 ZC02